



THE UNITED STATES PATENT  
AND TRADEMARK OFFICE

Serial No. : 10/609,181  
Applicants : Mayumi SUGIMOTO et al.  
Filed : June 26, 2003  
For : METHOD FOR GENE DIAGNOSIS  
OF BOVINE Hsp70 DEFICIENCY  
Art Unit : 1632  
Docket No. : 03279/HG  
Customer No.: 01933  
Confirmation No.: 1580

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify this  
correspondence is being  
deposited with the United  
States Postal Service with  
sufficient postage as First  
Class mail in an envelope  
addressed to:  
Commissioner for Patents,  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450  
on the date noted below.

*Richard S. Barth*  
Attorney: Richard S. Barth

Dated: February 3, 2004

In the event that this Paper  
is late filed, and the  
necessary petition for  
extension of time is not filed  
concurrently herewith, please  
consider this as a Petition  
for the requisite extension of  
time, and to the extent not  
tendered by check attached  
hereto, authorization to  
charge the extension fee,  
or any other fee required  
in connection with this  
Paper, to Account No. 06-1378.

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

S I R :

Enclosed is a Certified Copy; priority is claimed  
under 35 USC 119:

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filing Date</u>
JAPAN	2002-327856	November 12, 2002 .

Frishauf, Holtz, Goodman  
& Chick, P.C.  
767 Third Ave., 25th Floor  
New York, NY 10017-2023  
Tel. Nos. (212) 319-4900  
(212) 319-4551/Ext. 219  
Fax No.: (212) 319-5101  
E-Mail Address: BARTH@FHGC-LAW.COM  
RSB/ddf  
Enc.

Respectfully submitted,

*Richard S. Barth*

Richard S. Barth  
Reg. No. 28,180

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日  
Date of Application:

2002年11月12日

出 願 番 号  
Application Number:

特願2002-327856

[ST.10/C]:

[JP2002-327856]

出 願 人  
Applicant(s):

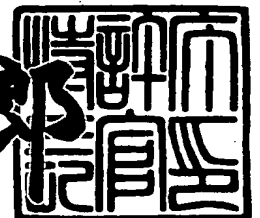
独立行政法人家畜改良センター  
社団法人畜産技術協会



2003年 6月17日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3047246

【書類名】 特許願

【整理番号】 P141292K

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特  
許出願

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61B 5/00  
C12N 15/00

【発明者】

    【住所又は居所】 福島県西白河郡西郷村大字米字中山前 2 3 0 番地

    【氏名】 杉本 真由美

【発明者】

    【住所又は居所】 北海道幕別町札内豊町 3 1 - 1 5

    【氏名】 古岡 秀文

【発明者】

    【住所又は居所】 福島県西白河郡西郷村大字米字中山前 2 3 0 番地

    【氏名】 杉本 喜憲

【特許出願人】

    【持分】 080/100

    【識別番号】 301029403

    【氏名又は名称】 独立行政法人 家畜改良センター

    【代表者】 理事長 南波 利昭

【特許出願人】

    【持分】 020/100

    【識別番号】 595038556

    【氏名又は名称】 社団法人 畜産技術協会

    【代表者】 山下 喜弘

【代理人】

    【識別番号】 100074077

    【弁理士】

【氏名又は名称】 久保田 藤郎  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100086221  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 矢野 裕也  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 009014  
【納付金額】 4,200円  
【その他】 国等以外のすべての者の持分の割合 0 2 0 / 1 0 0  
【提出物件の目録】  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 0106326  
【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ウシのHsp70 欠損症の遺伝子診断法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の工程を含むウシのHsp70 欠損症の遺伝子診断法であって、変異部位を含む領域がウシHsp70 遺伝子の塩基配列中、配列表の配列番号1に示される塩基配列の1997～11030 位を含む領域であることを特徴とするウシのHsp70 欠損症の遺伝子診断法。

(a) ウシの核酸試料を得る工程、

(b) 工程(a)にて得られた核酸試料を遺伝子増幅反応に付して、ウシのHsp70 遺伝子に存在しうる変異部位を含む領域が増幅された核酸断片を得る工程、

(c) 工程(b)の核酸断片について変異の存在を調べる工程、

【請求項2】 遺伝子増幅反応がポリメラーゼ連鎖反応法によって行われる請求項1に記載の遺伝子診断法。

【請求項3】 変異の存在をポリメラーゼ連鎖反応法による遺伝子増幅産物を調べることにより行う請求項1または2に記載の遺伝子診断法。

【請求項4】 核酸試料がゲノミックDNA、cDNA、又はmRNAを含む試料である請求項1～3のいずれか一項に記載の遺伝子診断法。

【請求項5】 被検ウシからゲノム連鎖解析を行い、ポジショナルクローニング法を用いてウシHsp70 遺伝子を単離し、常法により該遺伝子の塩基配列を決定し、該塩基配列を配列表の配列番号1に記載の正常ウシのHsp70 をコードするcDNAの塩基配列と比較して変異の有無を調べることを特徴とするウシのHsp70 欠損症の遺伝子診断法。

【請求項6】 ウシのHsp70 欠損症を検出するためのキットであって、ウシのHsp70 遺伝子に存在しうる変異部位を含む領域を遺伝子増幅反応により増幅するのに利用されるオリゴヌクレオチドプライマーを含有しており、しかも該オリゴヌクレオチドプライマーが、

(1) 配列表の配列番号1に示された塩基配列のうちの5' 末端の領域に相当する塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、及び

(2) 配列表の配列番号1に示された塩基配列のうちの3' 末端の領域に対する

相補塩基配列を有するオリゴヌクレオチド

からなる群から選ばれたものであることを特徴とするウシのHsp70 欠損症を検出するためのキット。

【請求項7】 オリゴヌクレオチドプライマーが、15～35個のヌクレオチドからなるものである請求項6記載のキット。

【請求項8】 オリゴヌクレオチドプライマーが、配列表の配列番号2～8に示された群から選ばれた1対（ただし、配列番号2と4、3と5および6と7の組み合わせを除く）のものであることを特徴とする請求項6記載のウシのHsp70 欠損症を検出するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ウシのHsp70 欠損症の遺伝子診断法（又は検出方法）に関する。

【0002】

本明細書において、「Hsp70」はHsp70 遺伝子が転写され翻訳されて生成したタンパク質を意味し、「Hsp70 遺伝子」はHsp70 をコードしている翻訳領域のエクソン部分、隣接している非翻訳領域のエクソン部分、それらのイントロン部分、該遺伝子の発現の制御に関わる領域に加え、本疾患に関連する変異部分が含まれるDNA の領域を意味する。

【0003】

【従来技術】

Hsp70 欠損症は、横隔膜筋症を主徴とする常染色体性劣性遺伝病であり、臨床的には鼓張症、呼吸不全などを呈し、病理組織学的特徴としては横隔膜筋に筋繊維変性およびコア様構造が認められる疾患である。本疾患は、ホルスタイン牛においては1994年以降発生が認められているが、ヒトにおいて同様な疾患の報告はない。

Hsp70 欠損症を発症したウシは、鼓張症を繰り返すため、発見することができる。しかし、一方の染色体上にのみ異常に関連した遺伝子を有するヘテロ接合体であるウシ、すなわち遺伝的にHsp70 欠損症のキャリアーであるウシについては

、その異常を知ることが難しい。

したがって、見かけ上は異常の認められないウシ同士を交配させた場合でも、生まれてくる子牛に異常が現れることがあり、本疾患の発生を未然に防ぐ上では問題を有している。

#### 【0004】

##### 【発明が解決しようとする課題】

ウシのHsp70 欠損症を予防する手段の1つとして、ヘテロ接合体同士の交配を避けるという方法が考えられる。しかし、この方法を可能にするためには、ウシのHsp70 欠損症の診断を遺伝子レベルで行い、疾患遺伝子のキャリアーを特定する必要がある。異常を持つウシの疾患遺伝子が、正常なものに比べてどのように変異しているかを明らかにし、様々な遺伝子工学的手法により、変異遺伝子を迅速に検出できる手段を得ることができれば、このような遺伝子診断法を確立することができる。

#### 【0005】

したがって、本発明の目的は、ウシのHsp70 欠損症の遺伝子診断法（遺伝子検出法）を提供することである。これにより、Hsp70 欠損症のキャリアーをスクリーニングすることによって、今後の本疾患の発生を未然に防ぐことができる。

#### 【0006】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、前記目的を達成するために研究を重ねた結果、本疾患と密接に関連する約11kbに及ぶDNA の欠損を見出すことに成功した。この欠損領域には、既にウシで報告されているHsp70 遺伝子 (M. D. Groz et al., Genomics, 14, 863-868 (1992); J. A. Gutierrez et al., Biochem. J., 305, 197-203 (1995)) を含んでいた。

さらに、本発明者らは、DNA の欠損という変異によりHsp70 が発現していないことが本疾患の原因であることを見出し、該遺伝子上に設定した特定のオリゴヌクレオチドプライマーを含む、オリゴヌクレオチドプライマーを用いる PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法により、かかる変異が検出されることを見出し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 0 7 】

本発明並びにその態様を以下に示す。

(1) 下記の工程を含むウシのHsp70 欠損症の遺伝子診断法であって、変異部位を含む領域がウシHsp70 遺伝子の塩基配列中、配列表の配列番号1に示される塩基配列の1997～11030 位を含む領域であることを特徴とするウシのHsp70 欠損症の遺伝子診断法。

(a) ウシの核酸試料を得る工程、

(b) 工程(a)にて得られた核酸試料を遺伝子増幅反応に付して、ウシのHsp70 遺伝子に存在しうる変異部位を含む領域が増幅された核酸断片を得る工程、

(c) 工程(b)の核酸断片について変異の存在を調べる工程、

(2) 遺伝子増幅反応がポリメラーゼ連鎖反応法によって行われる請求項1に記載の遺伝子診断法。

(3) 変異の存在をポリメラーゼ連鎖反応法による遺伝子増幅産物を調べることにより行う請求項1又は2に記載の遺伝子診断法。

(4) 核酸試料がゲノミックDNA、cDNA、又はmRNAを含む試料である請求項1～3のいずれか一項に記載の遺伝子診断法。

【 0 0 0 8 】

(5) 被検ウシからゲノム連鎖解析を行い、ポジショナルクローニング法を用いてウシHsp70 遺伝子を単離し、常法により該遺伝子の塩基配列を決定し、該塩基配列を配列表の配列番号1に記載の正常ウシのHsp70 をコードするcDNAの塩基配列と比較して変異の有無を調べることを特徴とするウシのHsp70 欠損症の遺伝子診断法。

(6) ウシのHsp70 欠損症を検出するためのキットであって、ウシのHsp70 遺伝子に存在しうる変異部位を含む領域を遺伝子増幅反応により増幅するのに利用されるオリゴヌクレオチドプライマーを含有しており、しかも該オリゴヌクレオチドプライマーが、

(1) 配列表の配列番号1に示された塩基配列のうちの5'末端の領域に相当する塩基配列を有するオリゴヌクレオチド、及び

(2) 配列表の配列番号1に示された塩基配列のうちの3'末端の領域に対する



相補塩基配列を有するオリゴヌクレオチド

からなる群から選ばれたものであることを特徴とするウシのHsp70 欠損症を検出するためのキット。

(7) オリゴヌクレオチドプライマーが、15～35個のヌクレオチドからなるものである請求項6記載のキット。

(8) オリゴヌクレオチドプライマーが、配列表の配列番号2～8に示された群から選ばれた1対(ただし、配列番号2と4、3と5および6と7の組み合わせを除く)のものであることを特徴とする上記(6)記載のウシのHsp70 欠損症を検出するためのキット。

【0009】

(9) ウシHsp70 遺伝子及びウシHsp70 欠損症の遺伝子に対応する塩基配列又はその相補鎖の全体又はその一部であって、

(a) 配列表の配列番号1で示された塩基配列又はその相補鎖の全体又はその一部、

(b) 前記配列(a)とハイブリッド形成し、PCRによりウシのHsp70 遺伝子に存在しうる変異部位を含む領域を遺伝子増幅するのに利用できるすべての配列、

(c) 遺伝子コードの縮退のために前記配列(a)及び(b)から派生した配列よりなる群から選ばれたものであることを特徴とする塩基配列。

(10) ゲノミック DNA配列、cDNA配列、RNA配列、ハイブリッド配列、合成配列、及び半合成配列からなる群から選ばれたものであることを特徴とする上記(9)に記載の塩基配列。

【0010】

(11) 上記(9)と(10)のいずれかに記載の塩基配列又は対応するmRNAとハイブリッド形成できることを特徴とするヌクレオチドプローブ。

(12) 上記(11)に記載のヌクレオチドプローブを用いてウシのHsp70 遺伝子に存在しうる変異部位を含む配列を明らかにし、及び／又は単離する工程を有することを特徴とするウシHsp70 欠損症の検出方法。

(13) 上記(6)～(8)のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

(14) 上記(13)記載のオリゴヌクレオチドプライマーを含有することを特徴とするウシのHsp70 欠損症用遺伝子診断試薬。

【0011】

【発明の実施の形態】

以下において、本発明を詳細に説明する。

請求項1記載の本発明は、ウシHsp70 欠損症の遺伝子診断法（検出方法）である。

後述するように、ウシHsp70 欠損症の原因となる遺伝子上の変異が解明された(図1(a))ことにより、この変異を利用して該疾患の検出を行うことができる。具体的なウシHsp70 欠損症の遺伝子診断法（検出方法）としては、次のような工程を含む態様が例示される。すなわち、

- (a) ウシの核酸試料を得る工程、
  - (b) 工程(a)にて得られた核酸試料を遺伝子増幅反応に付して、ウシのHsp70 遺伝子に存在しうる変異部位を含む領域が増幅された核酸断片を得る工程、
  - (c) 工程(b)の核酸断片について変異の存在を調べる工程、
- である。

【0012】

第1に、工程(a)について述べる。本発明に用いられるウシの核酸試料としては、Hsp70 をコードする塩基配列を有するものであれば特に限定されるものではなく、適当な細胞又は組織由来の核酸（全ゲノムDNA 及び細胞の全RNA から転写されたcDNAを包含する）、例えば、ゲノミックDNA、cDNA、mRNA等が挙げられる。ウシの核酸試料の調製は、公知の方法、例えばMolecular cloning, a laboratory manual (2nd edition) (J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (Ed.), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (1989))に記載の方法により行うことができる。

【0013】

第2に、工程(b)について述べる。工程(a)で得られた核酸試料および適当なプライマーを用いて、ウシHsp70 遺伝子に存在しうる変位部位を含む領域が増幅され、所望の核酸断片を得ることができる。

本工程で用いられる遺伝子増幅反応の方法としては、該領域を増幅できる方法であれば特に限定されないが、PCR 法、RNA ポリメラーゼを利用した核酸増幅法や鎖置換増幅法のような核酸増幅法を利用することができる。なかでもPCR 法が好ましく用いられる。

増幅の対象となる、変異部位を含む領域としては、ウシHsp70 遺伝子の塩基配列のうち、ウシHsp70 欠損症の原因となる変異を含んでいる領域であれば特に限定されず、例えば、配列表の配列番号 1 に示される塩基配列の中の1997～11030 位を含む領域が挙げられる。

#### 【 0 0 1 4 】

本明細書中、「ポリメラーゼ連鎖反応」又は「PCR 」とは、一般的に米国特許第4683195 号明細書に記載されている方法を指し、例えば、所望の塩基配列をインビトロで酵素的に増幅するための方法を指している。

一般に、PCR 法は、鋳型核酸と優先的にハイブリダイズすることのできる2 個のオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、プライマー伸長合成を行うところのサイクルを繰り返し行うことを含むものである。典型的には、PCR 法で用いられるプライマーは、鋳型内部の増殖されるべき塩基配列に対して相補的なプライマーを使用することができ、例えば、該増幅されるべき塩基配列とその両端において相補的であるか、あるいは該増幅されるべき塩基配列に隣接しているものが好ましく使用され得る。

#### 【 0 0 1 5 】

PCR 法は、M. A. Innis, D. M. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Ed.), PCR protocols: a guide to methods and applications, Academic Press, Inc., New York (1990); M. J. McPherson, P. Quirke & G. R. Taylor (Ed.), PCR: a practical approach, IRL Press, Oxford (1991); R. K. Saiki et al., Science, 239, 487-491 (1988); M. A. Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002 (1988) などに記載の方法あるいはそれを修飾したり、改変した方法により行うことができる。

また、PCR 法は、それに適した市販のキットを用いて行うことができ、キット製造業者あるいはキット販売業者により明らかにされているプロトコールに従っ

て実施することもできる。

【0016】

本明細書中、「オリゴヌクレオチド」とは、比較的短い一本鎖又は二本鎖のポリヌクレオチドで、好ましくはポリデオキシヌクレオチドが挙げられ、Agnew, C hem. Int. Ed. Engl., Vol. 28, p. 716-734 (1989)に記載されているような既知の方法、例えば、トリエステル法、ホスファイト法、ホスホアミダイト法、ホスホネート法などの方法により化学合成することができる。通常、合成は修飾された固体支持体上で便利に行うことができることが知られており、例えば、自動化された合成装置を用いて行うことができ、該装置は市販されている。該オリゴヌクレオチドは、一つ又はそれ以上の修飾された塩基を含有してよく、例えば、イノシンなどの天然においては普通でない塩基あるいはトリチル化された塩基などを含有していてもよい。

【0017】

PCR 法で用いるプライマーとしては、上記の変異部位を含むDNA 断片を増幅できるものであれば、特に限定されない。代表的には、プライマーは(a) 配列表の配列番号1に示された塩基配列のうちの任意の領域に相当する塩基配列を有するオリゴヌクレオチド及び(b) 配列表の配列番号1に示された塩基配列のうちの任意の領域に対する相補塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを使用することができ、より好ましくは(1) 配列表の配列番号1に示された塩基配列のうちの5' 端側の任意の領域に相当する塩基配列を有するオリゴヌクレオチド及び(2) 配列表の配列番号1に示された塩基配列のうちの3' 端側の任意の領域に対する相補塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを使用することができ、例えば、3～100個、好ましくは10～50個、さらに好ましくは15～35個のヌクレオチドを含有するものが挙げられる。

また、PCR 条件についても特に限定されず、通常行われる公知の条件でよく、例えば、上記した文献の記載を参考に選択することができる。PCR においては、DNA 鎖の熱変性、プライマーのアニーリング及びポリメラーゼによる相補鎖の合成からなる一つのサイクルが、例えば、10～50回、好ましくは20～35回、より好ましくは25～30回繰り返して行われる。

## 【0018】

第3に、工程(c)について述べる。本工程において、工程(b)で得られる核酸断片について変異の存在を調べる。変異の存在の検出方法としては、特に限定されないが、PCR法により得られたDNA断片長を調べることにより検出する。

DNA断片長を調べる方法は特に限定されないが、ポリアクリルアミド又はアガロースゲル上の電気泳動によりDNA断片を分離し、例えば、既知分子量のマーカーDNAフラグメントの移動度に対してのその移動度に基づいて、目的のDNA断片を同定する方法が好ましい。

## 【0019】

上記以外の検出法としては、前記に例示された態様の工程(c)をその他の変異検出方法に変更した方法がある。変異の検出には、例えば変異部位を含む適当なDNA断片をプローブに用いるハイブリダイゼーション法のような公知の変異検出方法が使用できる。さらに、増幅されたDNAを適当なベクターにクローニングして塩基配列を決定する方法や、あるいは増幅断片そのものを鋳型としてその塩基配列を決定する方法によっても変異の検出を行うことができる。

## 【0020】

オリゴヌクレオチドやプローブなどは、検出を容易にするためのラベル成分により標識されていることが好ましい。該ラベル成分は、分光学的手段、光学的手段、生化学的手段、免疫学的手段、酵素化学的手段、放射化学的手段などにより検出できるものであることができる。ラベル成分の例としては、ペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼなどの酵素、 $^{32}\text{P}$ などの放射性ラベル、アイソトープ、ビオチン、蛍光色素、発光物質、発色物質などが挙げられる。

## 【0021】

本発明のウシHsp70欠損症の遺伝子診断法(検出方法)により、Hsp70欠損症を発病しているウシのみならず、Hsp70欠損症のキャリアーのウシについても検出し、診断することができる。

したがって、本発明でいうウシHsp70欠損症とは、遺伝子的に異常であることを意味し、症状の有無を問わず、またキャリアーを含めて広義に解釈するものとする。

## 【 0 0 2 2 】

正常ウシ及びHsp70 欠損症発症ウシのHsp70 遺伝子の解析：

遺伝子上の変異と本疾患との関連を調べるために、まず正常なウシのHsp70 をコードする遺伝子 (cDNA) を単離し、その塩基配列を明らかにする。該遺伝子が単離された例はこれまで報告されていないが、本発明者らは、本疾患牛を含む家系のゲノム連鎖解析を行い、ポジショナルクローニング法と云われる手法を用いてウシHsp70 遺伝子を単離した。すなわち、連鎖地図上に原因遺伝子座のマッピングを行ったのち、その染色体領域より原因遺伝子を単離する方法（「動物遺伝育種学事典」、社団法人畜産技術協会発行）により実施した。

## 【 0 0 2 3 】

本発明により解明された正常ウシのHsp70 をコードするcDNAの全塩基配列を配列表の配列番号 1 に示す。DNA 断片の塩基配列の決定（シーケンシング）は、化学分解法（Maxam & Gilbert 法）、チェーンターミネーター法（Sangerジデオキシ法）などにより行うことができる。

## 【 0 0 2 4 】

Hsp70 欠損症の原因となる遺伝子上の変異は、正常ウシ及び発症ウシのHsp70 遺伝子の塩基配列を比較することによって明らかにすることができる。すなわち、前記の正常ウシの場合と同様に発症ウシのHsp70 遺伝子の塩基配列を調べ、これを正常ウシ遺伝子の塩基配列と比較することにより、該疾患の原因である変異を確認することができる。

## 【 0 0 2 5 】

本発明ではHsp70 欠損症ウシのHsp70 遺伝子上では配列表の配列番号 1 に示される正常ウシのHsp70 遺伝子上のHsp70 をコードする翻訳領域の塩基配列のうち 1997～11030 位の部分が欠損する変異を見出した（図 1 (a)）。

図 1 (a) において、HSPA1AおよびHSPA1Bは、いずれもHsp70 遺伝子である。このHsp70 遺伝子は、ほとんど同じ配列の 2 つの遺伝子が染色体上に横並びしているものから成る。また11kbの欠損部位は、HSPA1Aの3' 側の非翻訳領域から始まり、HSPA1Bの翻訳領域の3' 側末端で終わる。

## 【 0 0 2 6 】

## 【実施例】

以下、本発明を実施例をもってさらに詳細に説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。以下の記載では、特に説明がない場合には、D. M. Glover & B. D. Hames (Ed.), DNA Cloning 1, Core Techniques (2nd edition), A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford (1995); J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (Ed.), Molecular cloning, a laboratory manual (2nd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); M. A. Innis, D. M. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White (Ed.), PCR protocols: a guide to methods and applications, Academic Press, Inc., New York (1990); M. J. McPherson, P. Quirke & G. R. Taylor (Ed.), PCR: a practical approach, IRL Press, Oxford (1991) に記載の方法あるいはそれを修飾したり、改変した方法により行われている。また、市販の試薬キットや測定装置を用いている場合には、特に説明がない場合、それらに添付のプロトコルの指示に従って行っている。

## 【0027】

## 実施例 1

## (1) 正常ウシHsp70 遺伝子の塩基配列の決定

Hsp70 欠損症の疾患牛（12頭）及びそれらの両親／娘牛からなる家系について、多型性DNA マーカーを用いてHsp70 欠損症と連鎖するウシ染色体の領域を決定した。すなわち、連鎖地図上にあるDNA マーカーのうち疾患と最も強く連鎖するマーカーを選抜した。ウシの人工大腸菌染色体(BAC) ライブラリー [CHILDREN'S HOSPITAL OAKLAND - BACPAC RESOURCES製] からこの領域に存在するBAC クローンを分離した。

このBAC のクローンを材料にショットガン塩基配列決定法を行った。まず、ネブライザーで物理的にBAC クローンのDNA を約700 bpの大きさに細断し、両端をDNA ポリメラーゼで平滑にし、プラスミドにクローニングした。これらのプラスミドクローンから無作為に選び、それぞれ両端からBigDye Terminator Cycle Sequencing試薬(PE バイオシステムズ社製) により、3700蛍光DNA シークエンサー(PEバイオシステムズ社製) を用いてその塩基配列を決定した。得られた塩基配

列を配列表の配列番号 1 に示す。この塩基配列を他の既知の遺伝子 (GenBank のデータベースに登録されており、塩基配列が決定されている遺伝子) と比較したところ、Hsp70 遺伝子であることが判明した。

【 0 0 2 8 】

## (2) Hsp70 の発現

筋肉を磨り潰したものを遠心することによって得られる上清である可溶画分を該疾患牛の横隔膜筋から調製し、Hsp70 の発現について常法に従って調べた。すなわち、可溶画分を、SDS を含む 10% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動して、ニトロセルロースメンブレンにブロットし、Hsp70 に対する抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社製) をプローブにして Hsp70 の発現を調べるウェスタンブロットを行ったところ、正常ウシに比べ該疾患牛ではほとんど発現していないことが明らかとなった。

【 0 0 2 9 】

## (3) Hsp70 欠損症ウシ Hsp70 遺伝子の塩基配列の決定

実施例 1 (2) に述べたように、Hsp70 欠損症ウシでの Hsp70 の発現が認められないことから、該疾患牛の Hsp70 遺伝子の塩基配列を決定した。すなわち、配列表の配列番号 1 の配列を参照しつつ PCR を行い、Hsp70 欠損症ウシにおける Hsp70 遺伝子の DNA 塩基配列を決定した。

このようにして決定された塩基配列を、前記の正常ウシについて決定されたものと比較した結果、Hsp70 欠損症ウシの Hsp70 遺伝子では、配列表の配列番号 1 に示された塩基配列中、1997～11030 位を含む約 11 kb の欠損が認められた。このため、該疾患牛では Hsp70 の発現が見られないと考えられる。

【 0 0 3 0 】

## 実施例 2

### Hsp70 正常型の検出：

ウシのゲノミック DNA 上の Hsp70 の正常型を確認するため、Hsp70 欠損症ウシに認められた欠損部位を含む DNA 断片を増幅するためのプライマー F1、R1、F2、R2 (配列表の配列番号 2 - 5) を配列表の配列番号 1 の塩基配列を基にして合成した。これらプライマーの塩基配列上の位置を図 1 (b) に示す。



## 【 0 0 3 1 】

正常ウシの血液、Hsp70 欠損症ウシの筋肉、及びその母牛又は娘牛の血液（抗凝固剤としてEDTA、ヘパリンを含む）より、QIAamp blood kit又はQIAamp tissue kit（QIAGEN社製）を用いてゲノミックDNA を調製した。

これらのゲノミックDNA を鋳型とし、プライマーF1とR1及びF2とR2を用いたPCR（Animal Taq を使用、94℃で20秒、60℃で30秒、72℃で1分間からなる工程を1サイクルとした35サイクル反応）を行い、反応液を1.5%ゲル（1x TBE）を用いた電気泳動に供し、泳動後のゲルをエチジウムブロマイド染色して増幅DNA 断片を確認した。

正常ウシとHsp70 欠損症ウシの母牛又は娘牛のゲノミックDNA を鋳型とした場合、図2(a)に示すように、422 bp及び198 bpのDNA 断片の増幅が見られた。しかし、Hsp70 欠損症ウシのゲノミックDNA を鋳型にした場合は、増幅が認められなかった。

## 【 0 0 3 2 】

## 実施例 3

## Hsp70 変異型の検出：

ウシのゲノミックDNA 上のHsp70 遺伝子の変異型が有ることを確認するため、実施例1(3)に記載の約11 kb の欠損部分の両端にプライマーF3、F4、R3（配列表の配列番号6-8）を合成し（図1(b)）、実験に供した。

## 【 0 0 3 3 】

正常ウシ、Hsp70 欠損症ウシ、及びその母牛又は娘牛のゲノミックDNA を鋳型とし、プライマーF3とR3及びF4とR3を用いたPCR（Animal Taq を使用、94℃で20秒、60℃で30秒、72℃で1分間からなる工程を1サイクルとした35サイクル反応）を行い、反応液を1.5%ゲル（1x TBE）を用いた電気泳動に供し、泳動後のゲルをエチジウムブロマイド染色して増幅DNA 断片を確認した。

Hsp70 欠損症ウシ、及びその母牛又は娘牛のゲノミックDNA を鋳型とした場合、図2(b)に示すように、2028 bp 及び2008 bp のDNA 断片の増幅が見られた。しかし、正常ウシのゲノミックDNA を鋳型にした場合は、増幅が認められなかった。

## 【 0 0 3 4 】

これらの結果より、Hsp70 遺伝子の翻訳領域を含む約11 kb の欠損について、発症ウシの母牛又は娘牛はこの変異に関してヘテロ接合体であり、Hsp70 欠損症が染色体性劣性遺伝をする遺伝性疾患であることが確認された。

## 【 0 0 3 5 】

## 【発明の効果】

本発明によれば、遺伝子工学的手法により、ウシのHsp70 欠損症及びそのキャリアーを簡便、かつ迅速に検出し、診断することが可能である。また、そのために使用するキットが提供される。

## 【 0 0 3 6 】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Japan Livestock Technology Association

<120> Gene Diagnosis for Bovine Hsp70 Deficiency

<130> P141292K

<160>8

<210>1

<211>12988

<212>DNA

<213>Bovine

<400>1

```
acgtcgttga tcctgtgggc cgttttcagg tttgaagctt atctcggagc cgaaaaggca 60
gggcaccggc atggcgaaaa acatggctat cggcatcgac ctgggcacca cctactcctg 120
cgtaggggtg ttccagcacg gcaaggtgga gatcatcgcc aacgaccagg gcaaccgcac 180
cacccccagc tacgtggcct tcaccgatac cgagcggctc atcggc gatg cggccaagaa 240
ccaggtggcg ctgaaccgcg agaacacggt gttcgacgcg aagcggctga tcggccgcaa 300
gttcggagac ccggtggtgc agtcggacat gaagcactgg cttttccgcg tcatcaacga 360
cggagacaag cctaaggtgc aggtgagcta caaaggggag accaaggcgt tctacccgga 420
```

ggagatctcg tcgatggtgc tgaccaagat gaaggagatc gccgaggcgt acctgggcca 480  
 cccggtgacc aacgcggtga tcaccgtgcc ggcctacttc Aacgactcgc agcggcaggc 540  
 caccaaggac gcgggggtga tcgcggggct gaacgtgctg aggatcatca acgagcccac 600  
 ggccgccgcc atcgccctacg gcctggacag gacgggcaag ggggagcgca acgtgctcat 660  
 ctttgatctg ggagggggca cgttcgacgt gtccatcctg acgatcgacg acggcatctt 720  
 cgaggatgaag gccacggccg gggacacgca cctgggcggg gaggacttcg acaacaggct 780  
 ggtgaaccac ttcgtggagg agttcaagag gaagcacaag aaggacatca gccagaacaa 840  
 gcgggccgtg aggcggctgc gcaccgcatg cgagcgggcc aagagaacct tgtcgtccag 900  
 caccaggcc agcctggaga tcgactccct gttcgagggc atcgacttct acacgtccat 960  
 caccaggcg cggttcgagg agctgtgctc cgacctgttc cggagcacc tggagcccgt 1020  
 ggagaaggcg ctacgcgacg ccaagctgga caaggcgcag atccacgacc tggtcctggg 1080  
 ggggggctcc acccgcatcc ccaaggtgca gaagctgctg caggacttct tcaacgggcg 1140  
 cgacctaac aagagcatca accccgacga ggcggtggcg tacggggcgg cggtgcaggc 1200  
 ggccatcctg atgggggaca agtcggagaa cgtgcaggac ctgctgttgc tggacgtggc 1260  
 tccccgtcg ctgggactgg agacggccgg aggcgtgatg accgccctga tcaagcgcaa 1320  
 ctccaccatc cccacgaagc agacgcagat cttcaccacc tactcggaca accagccggg 1380  
 cgtgctgac caggtgtacg agggcgagag ggccatgacg cgggacaaca acctgctggg 1440  
 gcgcttcgag ctgagcggca tcccgccggc cccgcggggg gtgccccaga tcgaggtgac 1500  
 cttcgacatc gacgccaatg gcatcctgaa cgtcacggcc acggacaaga gcacgggcaa 1560  
 ggccaacaag atcaccatca ccaacgacaa gggccggctg agcaaggagg agatcgagcg 1620  
 catggtgcag gaggcggaag agtacaaggc ggaggacgag gtccagcgcg agagggtgtc 1680  
 tgccaagaac gcgctggagt cgtacgcctt caacatgaag agcgccgtgg aggatgaggg 1740  
 gctgaagggc aagatcagcg aggcggacaa gaagaagggt ctggacaagt gccaggaggt 1800  
 gatttcctgg ctggacgcca acaccttggc ggagaaggac gagtttgagc acaagaggaa 1860  
 ggagctggag caggtgtgta accccatcat cagcagactg taccaggggg cgggcggccc 1920  
 cggggctggc ggctttgggg ctccaggccc taaagggggc tctgggtctg gcccaccat 1980  
 tgaggaggtg gattaggaat ccttccctgg attgctcatg tttgttatgg agactgttgg 2040  
 gatecaaggc tttgattgc cttatatatc ttcctttcat cagccatcag ctatgcaagc 2100  
 tgtttgagat gttgaactgt cccttttatg aaattaggaa ctcttttttc cagagtctta 2160

agtatagagc tgaatgtata gtgccatctt ttgtcagttt cttttttag tag tattcatgcc 2220  
 aaactcaagc tatttttcac ccgtttctgt ttacttccaa gtaaataaac tcaaataatt 2280  
 cgagtgatgt ttgcttctgt gtttttattt tgaagttaga aggatctgta gaggttgtct 2340  
 gttttacagt atccaaaaat gaactgcaat tggcctctta gataaggta gggatccaga 2400  
 aaagaatata gcattatgac acatttcttt taggcaaata gtatccttgg gaaacataaa 2460  
 gctgctcatt tgaatggttg tgtttgtgaa tccagaaaat gtttaagggtt actggcatgg 2520  
 tagcctcaag gttgggcggg ggggtccatac ttacgggtg aactcaaaag gtgcctgtag 2580  
 tggcagtatt cctggagaag caggcaaata agaggcagtt agattggaag tcatgggtgc 2640  
 tgctgcttgt tagtacaggt gataccttag agccttggtta cttaatctag attcagcatg 2700  
 aaagagaagg tgagtcctaa attggcactg aggaaatgtg aattctagta ctggcttgcc 2760  
 taattatgca tgattgcgtt agccactgtg atcctcaagt ctacacagttt aaaatggaag 2820  
 ggtttggcct gatgctaaag ttttaatttct taaaagaatg ctgagataaa aatgctgcgt 2880  
 ttccagtact ggttacctac attttaagta tcccagttag taccttagag aggtgtcact 2940  
 gtttcatgcc ccagcaggag gacggacccc cagtatttca gtgtgcttac ctaccaggt 3000  
 ctgtaccagg ggccttttac atgtttatta attccattc caccatattg agtataggca 3060  
 gtgtttggct tccacagggtg gacgtatgtg gagacttaaa aggcactggc ttaaatttat 3120  
 tacaagggtta aaaaaacggg ttcagggaag atgttgaacc tggattccaa ctgaggtttt 3180  
 attgtttttt gctctgctgc ccacagggtt ttgtgcatgt ctggttctgg gtctacccta 3240  
 ggtttcacaa tcggtaatct ttctgctttg acaatgtata atcctaaaca actatgtcag 3300  
 ataatacggg taatgctaga ggtttaatac tggtttaattt agaagagtga ttgaaaaaac 3360  
 ctgcagcact gcaccaggaa gccttaacca caggcttctt tcccctgcag atgcttcttg 3420  
 ctttaactgt tgctagaatt ctgggaagag tcccctccac agcctgtttg tgggaaaagg 3480  
 cctggcacaa tcctcacgac ttggggagtg agccccctta aaaggcaatt ttatctgggg 3540  
 attacagaga ttctggaacc aggttggaagt ggtgattgca caaactgggc tagggaccac 3600  
 taaattctac actttaaaat ggtttatgtg aattcaccaa aagtagtttt taaaaaaaaa 3660  
 ttgtgtcaac attctggaaa aacactttgt gagtgtgtgt atctcaaggc ccaccaaatt 3720  
 ttactactaa tacttgcatg agaagaaact cttaatggta ataacatgta gaggttagacc 3780  
 tgtccctgta agtttggaaa tggaaatcta agagatgctt agacttgag gccagcatat 3840  
 aaacacaggt ttaatcctca gggttaggtga actgtagcac ggtggactgt agccacaatg 3900

tgagtcaccc ttcattgggga tatgcggttg gaacacgacc tcctctaccc ccacagaact 3960  
 gcagtaccat ctgtgactgt catctgcaga taatacaata actcttgaag cagtcaccct 4020  
 acttttagggg gaggtggcaa gggatgggga gggtaggggtg gagattggga aagacctaac 4080  
 aaacaccttt gataagagag attagggaata tctccagaaa ttaatttga gaaaatgagt 4140  
 tcctatggct aaaccagtta agattatcag ggtgttttat taggaagtca atatataatg 4200  
 ttactgcaca gtcccttgca cagactactt tgaaaataat caccttcaac atgaagctga 4260  
 gggacaaaaga gaatgcaaag tcattcctgg agaaggtgat tgcggtagca gcaagaactc 4320  
 ggggtggggg tgggggggag gaggtgcac aaggaaaaat aatggtcgat caaaaagcat 4380  
 ttttaaaatc taacaccttc cctaattcca atctcaccta ctccctatg ccagccctga 4440  
 aaaattagat tgttatggta atgtgactga ttttaaatcc aagatactac gttattaaca 4500  
 catagttact cctgggtgtt aactggattc tgtcattaaa aatgaaaagg ataccaaagc 4560  
 aataacataa ttgtgagaga agtgcacaga agcatgggct ttcagttaaa ataatgggtt 4620  
 ttcaggtgaa aagtcaacac tggcgatttc tgagggggcg agcctcaagg taggaataag 4680  
 aaagggaac tgtcatcatt ctttattcca actgatcacc ttaaattccat cccaagggt 4740  
 caccgcgaaa gtatccagtg cagttcagta ggatatagca accccatcag tcctctccta 4800  
 actccagctc acgtagagac gtttaagggt caggtatcgc agcgaattcg ggatgccgag 4860  
 ccaacctgcc ccacccacg ggcgccagta ccgccagca ggaaatcgga ggaaaggga 4920  
 cggcggggaa ggaggaggag cacacaggaa atacagggtg agggggcggg ggagtccaga 4980  
 agatcagaat caccacagag gatcttccac ctttttacc gtccagacgt cccagggaga 5040  
 gccagggact agattcggga gatgggacgg cggcagagag aagacagcaa gctccagct 5100  
 gtagccaatc cctgccagg gctgcggctc accgcctct ggcggtgggg accttctagc 5160  
 ttctggcaac cccaatccat ccgacttact tgtgtcagtt acaaacctgt ccagtgtttt 5220  
 caccacaat attagcgagt ttgagggaata ctctaaaggt ctctccttta ctgactcctt 5280  
 taatcccatt ttgaaaaaga accgaagaac gccggcaccg gccaggcaac tccgcgcca 5340  
 gccccgccgt caggccccgc ccgctccat cggggtctta ctgctctgg ctcttgccc 5400  
 ccgtttcggg ctgtgtcagg aactttctgg agctctctgg gctcagaggc ggggactggc 5460  
 tcgtaggaac actcttcaac aaacaaactg cccacccaa gtctccctcc ctctctgt 5280  
 taacagccga ccagtctgtg ataacgggaa ggggagacgg tcctgggaga acctggaagg 5580  
 gccgaaaagg tggaagtgtg ggtgttgtcg ggggaagcgg cggagctggg ggtgcgtaga 5640

taggcgtgag tcagaagcaa cagcctggag gtgagtctcc gcaggtcaca ccccccatg 5700  
 gtgcacgtag agccctggca ttcactcttt actgtcgtcc atggttggtt ctgttcttct 5760  
 tttatagagc gtggaacgat agggtttatg tgccagcatt gagaggagtc caaagtagaa 5820  
 agtatgccga catgttagtt caatcaccgg ttccgtaatt acctgtctgg gtgatctggc 5880  
 caagccacga aacctctgaa cttttgtgct catctttgaa aacagaaagg tttggctgaa 5940  
 ggactctgcc taaaaatctg aagatagttt ttatggtaaa ccgaaagtat tactatcata 6000  
 gtcctggtag taatcccca ctttgtaagc acctcagtaa gaaatgattg agagatgaga 6060  
 ctcgagagag tgttacttca ataaaagaat gaagggcaca aacttttgag tacaactctg 6120  
 tcacagccac tgaactagtc ttttaaatat tgtctttgta atccttgatg gtatcatact 6180  
 atgaaataaa tattaattct aatttataca acttgtgtaa tttagttcat ttacacgtac 6240  
 ttcatgttta agaaagaaaa acagcttcaa caaggagata gagtccagat acaaaccag 6300  
 gtcttgccct tcccagtttt ttccccatg ctgctggaaa ttagcagagt tcccaggcct 6360  
 ttgccacact tccctggtag atcagagggt gaagaatctg cccacagtgc aagagacctg 6420  
 ggttctatcc ctgagtagag aagatcccct ggagaaggga atggcgaccc actccagtgt 6480  
 tcttgtgtgg aaaatcccat gggcagagga gcctggccgg ctacagtcca cggggtcaca 6540  
 aaggagtcgg acatgactgg gtgactaaca ctgtcaggcc tttgcccttt gaaggttaca 6600  
 aatgcctggc tcagggtctg cctgggtggct catcggtaaa gaatccgcct gccaatgcag 6660  
 gagacacagg ttctattcct gatccaggaa gattcccaca tgtcctcgtt ccaaggagca 6720  
 gctaagcctg tgtgccacaa ctattgagca cgtacagccc attctctgaa acaagagaag 6780  
 ccaccacaat gagaagcctg cttaccccca actcaactag agaatagcct ctgctcacca 6840  
 caactagaga aaagcctctg tagcagcaga gatctagcac agccaaaaat aaaatgaaaa 6900  
 aatgcctggc tctaggtgtc acattgttct cttttgcttc tgtctgaaaa acctagaatt 6960  
 atactgtctt ttaaaaacaa atagacttga gaaaaacat actagatgaa aaactgtagg 7020  
 aaaaaggaga gagaacaaaa aaagatcctg caacttcagg gtgaggacgg ctccccccgc 7080  
 cccacccact tccttcctt ggcagttagc attcttgga gtcctctcc catccccaac 7140  
 ccttaaattt taccctgtca cccggtcagg cttgggcaac cttaatcttg attcttccaa 7200  
 aactaaacc cgattttaaa aaactaattc caaatgcat caaataaagt tgtgaaaagt 7260  
 ctcttgggat tcttaaaatc tccttgctgc tgctgtact aagtcgttc agttgtgtcc 7320  
 aactctgtgc aacccacag acggaagccc accaggctcc ccaatccctg ggattctcca 7380

ggcaagaaca ctggagtggg ttgccatttc cttctccaat gcatgaaagt gaaaagtgaa 7440  
 agtgaagttg ctcaggagtc cgactcttag cgaccccatg gactgcagcc taccaggctc 7500  
 ctccgttcat gggattttcc aggcaagaac actggagtgg gttgccattg cttcttagag 7560  
 ttacactatt acactcattg atcatatata gaactataca tttgatcaac tgcttcaagt 7620  
 ctagtcatca tttctgttga aagctcagtc atatacttgg taatacaaga aataataatc 7680  
 ttgtgaaaca agcaaaatac aaatgggtata gttaataaca ttagtggaac taaaaggaga 7740  
 tatttttagcc atgagcctcc cacaccagtt ttttttaaag attgtcaaga ctaggggaatg 7800  
 ggtacttaga gcagaaatct gatttttcat gtggttcaaa tgtgttacat taaaggattt 7860  
 atcaggtaca aaaatacagc attcagtttg aattatagca cagctatctc cctgagatgc 7920  
 tgtcaagagt cttgcagttg tgtagcaggg cttttctcat tatagagatc tcagaagtca 7980  
 ataggtgaat agcctgatta tcatttaaag cttatgaaag ttgttaaggc ttagatatgg 8040  
 tcaattacat cctccaaccc cattgaaggc atgcacacgc gtgcgcacgc gcgcacacac 8100  
 acacacacac acacacacgc tgctaaatgg tcatacacca aatctcctta ggcaccaatt 8160  
 aaaccggtac ctgagttcct gccttgggaa gtgtccagtg ttaaaggaag acaaaattca 8220  
 agagactctc ctcataggaa atggaaaaga aatacggata tttaggtttc cgggtcatcc 8280  
 acagagagag acaacgcaaa gtgtaggtta atacagtgtg tagctgactg cttgattcat 8340  
 gaaaaacagc attttcaagt ggctcccca ctcctccacc ccagcaacag caagatttga 8400  
 ggccctatca cctgtctccc tgctgagcag tggagacaat gatgccctt gcttcaagcc 8460  
 aatagaggaa gagaactgca aattttggag aggagagcga atccagaatt cctgctggta 8520  
 gcagctgatg ggggagaagg caatggcaac ccactccagt gttcttgcct ggagaatccc 8580  
 agggacgggg gagcctggtg ggctgctgtc tctggggtcg cacagagtcg gacacaactg 8640  
 aagtgactta gcagtagcag cagcagctga tggtagaggaa gacaggggag aggggatgag 8700  
 gttaaggact tctctggagg tgaacacttc tctggaagtg ttcacaaact gggtaggctaa 8760  
 gatggacgtt tggggaatcc cctttcagat actgcataaa gagatggaaa attcctgaag 8820  
 ttttaaccagt ttgactagat taaggagggtg attcattgga gagccacacc tgaatgtaaa 8880  
 aaaagttatc acctacctgc acagtgaaag ataaaaatat tgctttaaca aatctgtata 8940  
 tctgattaac ctgaacaaat tataaaataa actgaatacc ctcagatttc aggaagaggt 9000  
 gtttgatgaa tggctgtgcg cgcgcgcgcg cgtgtgtgtg tacgtgtgta aacgtcagtt 9060  
 aagcaaaagt gttcaaagcg agatttcttc cctttatcag aaattgcctc ctcaggtact 9120

tctctggtgg tccagaaggg ctaagactct gtagaggaga atgcaggcgg cctgggttcg 9180  
atctctgggtc aagaaaatag atccccatg ctacaactaa gattgaccat gctacaacta 9240  
aggcttagct attaatttta aaacaacaac aacaaaaccc cacaactgcc tctccgact 9300  
tgtgtgttta tgttttctat gctcaagaca tgtggataca gtaatgagtc tatttcattg 9360  
gttgtgaatc ccctctacta tggctttaat gtccctcaca ttttacttt aggtgcctaa 9420  
taagggatct tgcattgccc ataaaggaag aagaaacaaa agccaaaata aattaccaa 9480  
tgtcactgta tttaaaacag gaaggaggct aacaacagaa agctgaaatc taggataaaa 9540  
agttaaatgg acgaattaag tacacagcaa acaacctgaa ctttttagagg agatagaacc 9600  
taggtcctgc caacctttct caccttccag catcattcca gactgtttac aatgggccac 9660  
ccgccaacca actatatagc atgctcttca aacaggactg aacgctcccc cacccccacc 9720  
ctcgcaggct caccaccaca ccacatttac ttaaaagtag tggacagcct aggagccgca 9780  
aatgacaagg cagaagaccg aattcgggac tcaggttaat ccaggcacca ctgatcatcc 9840  
gaggctgaac caggaattta aaaggcacag aggaggggag ggggtgcgtcc gcacctgggg 9900  
ctgggaaaga tgaggaatcc ggagaagcgc aaaggacagc taaatatcta tggaaaatat 9960  
tttctttctc aagcccagtc cagcccaggg agaaaggag cagctctggg cggggacagg 10020  
ggcgtgttg ctccagccct gcccttccca cgctccccg accgagcagg tcccttctaa 10080  
ggcgttggga accttctaca atctaaaaac catataccta attgattttc ttctgaaaat 10140  
taaaatttcc cctcccatct gaatagggt aaagaggagc caaaacttaa acagcttcaa 10200  
ctctctcctt ttccttccca ttttaaaaat aagatgggaa aagcgccgcg gatgaccaag 10260  
gcatttctcg gacagcccg ccgctcggcg agccagccca aacgtggctg cttccatcag 10320  
cgttagcctc cgatcactct ccttggccca cagatagcca accctcttcg agaaactcgg 10380  
gaactttctg tattttggct gtcccggcag tcgtgtagcc ctttaattcta ctttaacca 10440  
ccaaactaat ttgagccccg agatcctctc accgccctac aattaattac aagcccaggg 10500  
ctgaccttc cagtcgactc caaactactt ggctggctgg tcgccaggaa accagagaca 10560  
gagtgggtgg accttcccag cccctctccc cctctcctta ggactcctgt ttcctccagc 10620  
gaatcctaga agagtctgga gagttctggg aggagaggca tccagggcgc tgattggttc 10680  
cagaaagcca gggggcagga cttgaggcga aaccctgga atattcccga cctggcagcc 10740  
ccactgagct cggtcattgg ctgacgaagg gaaaaggcgg cggggcttga tgaagaatta 10800  
taaacacaga gccgcctgag gagaaacagc agcctggaga gagctgataa aacttacggc 10860



ttagtccgtg agagcagctt ccgcagaccc gctatctcca aggaccgccc cgagggggcac 10920  
 cagagcggtc agttttcggg ttccgaaaag cccgagcttc tcgtcgcaga tcctcttcac 10980  
 cgatttcagg tttgaagctt atctcggagc cgaaaaggca gggcaccggc atggcgaaaa 11040  
 acacagctat cggcatcgac ctgggcacca cctactcctg cgtaggggtg ttccagcacg 11100  
 gcaaggtgga gatcatcgcc aacgaccagg gcaaccgcac cacccccagc tacgtggcct 11160  
 tcaccgatac cgagcggctc atcggagatg cggccaagaa ccagggtggc ctgaacccgc 11220  
 agaacacggt gttcgacgcg aagcggctga tcggccgcaa gttcggagac ccggtggtgc 11280  
 agtcggacat gaagcactgg cttttccgcg tcatcaacga cggagacaag cctaaggtgc 11340  
 aggtgagcta caagggggag accaaggcgt tctaccgga ggagatctcg tcgatggtgc 11400  
 tgaccaagat gaaggagatc gccgaggcgt acctgggcca cccggtgacc aacgcggtga 11460  
 tcaccgtgcc ggcctacttc aacgactcgc agcggcaggc caccaaggac gcgggggtga 11520  
 tcgcggggct gaacgtgctg aggatcatca acgagcccac ggccgcccgc atgcctacg 11580  
 gcctggacag gacgggcaag ggggagcgca acgtgctcat ctttgatctg ggagggggca 11640  
 cgttcgacgt gtccatcctg acgatcgacg acggcatctt cgaggatgaag gccacggccg 11700  
 gggacacgca cctgggcggg gaggacttcg acaacaggct ggtgaaccac ttcgtggagg 11760  
 agttcaagag gaagcacaag aaggacatca gccagaacaa gcgggcccgtg aggcggtgc 11820  
 gcaccgcatg cgagcgggcc aagagaacct tgtcgtccag caccaggcc agcctggaga 11880  
 tcgactccct gttcgagggc atcgacttct acacgtccat caccaggcg cggttcgagg 11940  
 agctgtgctc cgacctgttc cggagcacc tggagcccgt ggagaaggcg ctacgcgacg 12000  
 ccaagctgga caaggcgag atccacgacc tggctctggt ggggggctcc accgcacatc 12060  
 ccaaggtgca gaagctgctg caggacttct tcaacggcg cgacctcaac aagagcatca 12120  
 accccgacga ggcggtggcg tacggggcg cggtgcaggc ggccatcctg atgggggaca 12180  
 agtcggagaa cgtgcaggac ctgctgttgc tggacgtggc tcccctgtcg ctgggactgg 12240  
 agacggccgg aggcgtgatg accgccctga tcaagcgcaa ctccaccatc cccacgaagc 12300  
 agacgcagat cttaccacc tactcggaca accagccggg cgtgctgatc cagggtgtacg 12360  
 agggcgagag ggccatgacg cgggacaaca acctgctggg gcgcttcgag ctgagcggca 12420  
 tcccgccggc cccgcggggg gtgccccaga tcgaggtgac cttcgacatc gacccaatg 12480  
 gcacatctgaa cgtcacggcc acggacaaga gcacgggcaa ggccaacaag atcaccatca 12540  
 ccaacgacaa gggccggctg agcaaggagg agatcgagcg catggtgcag gaggcggaaa 12600

agtacaaggc ggaggacgag gtccagcgcg agagggtgtc tgccaagaac gcgctggagt 12660  
 cgtacgcctt caacatgaag agcgccgtgg aggatgaggg gctgaagggc aagatcagcg 12720  
 aggcggacaa gaagaagggtg ctggacaagt gccaggaggt gatttcctgg ctggacgcca 12780  
 acaccttggc ggagaaggac gagtttgagc acaagaggaa ggagctggag caggtgtgta 12840  
 accccatcat cagcagactg taccaggggg cgggcgggc cggggctggc ggctttgggg 12900  
 ctcaggggccc taaagggggc tctgggtctg gccccacat tgaggaggtg gactaggggc 12960  
 cttacttttt gtctgtctgt agtagacc 12988

<210>2

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400>2

aaccccatca tcagcagact 20

<210>3

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400>3

cacagaagca aacatcactc g 21

<210>4

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400>4

gcattgccca taaaggaaga 20

<210>5

<211>22

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400>5

tggaaggtga gagaaaggtt gg 22

<210>6

<211>19

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400>6

acgtcgttga tcctgtggg 19

<210>7

<211>19

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400>7

tatctcggag ccgaaaagg 19

<210>8

<211>29

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide to act as a primer for PCR

<400>8

ggtctactac agacagacaa aaagtaagg 29

【図面の簡単な説明】

【図 1】

(a) Hsp70 欠損症ウシ由来のウシHsp70 遺伝子の欠損部分を示す図である。

(b) 欠損部分を検出するためのPCR プライマーの位置を示す。

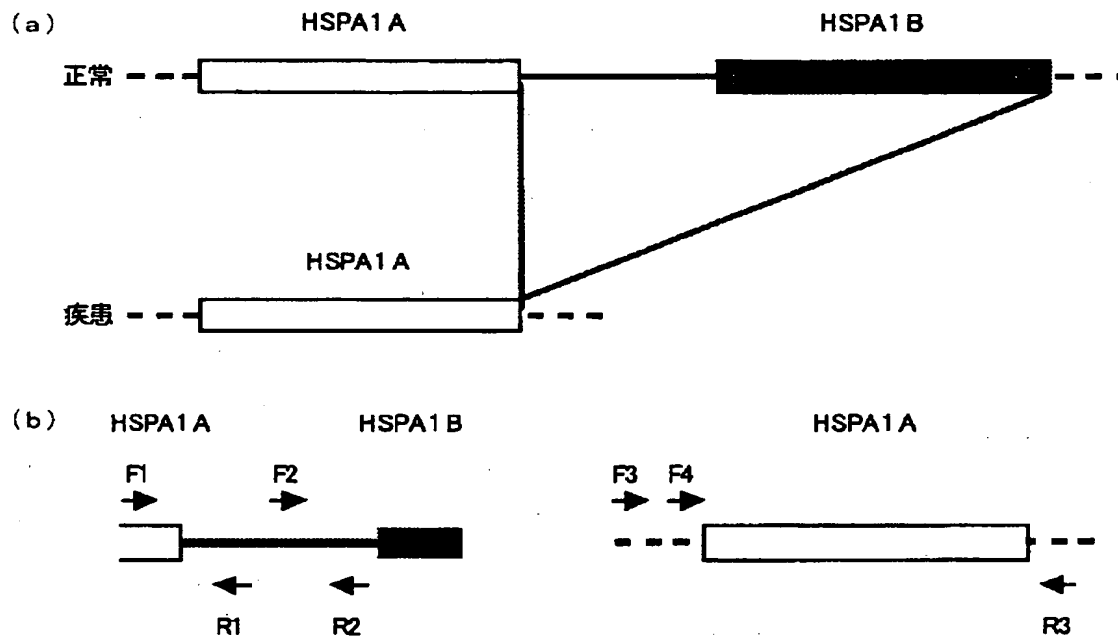
【図 2】

(a) Hsp70 正常型の検出：Hsp70 遺伝子の変異のないゲノミックDNA を鋳型とすれば、PCR で増幅することを示す電気泳動パターン図である。

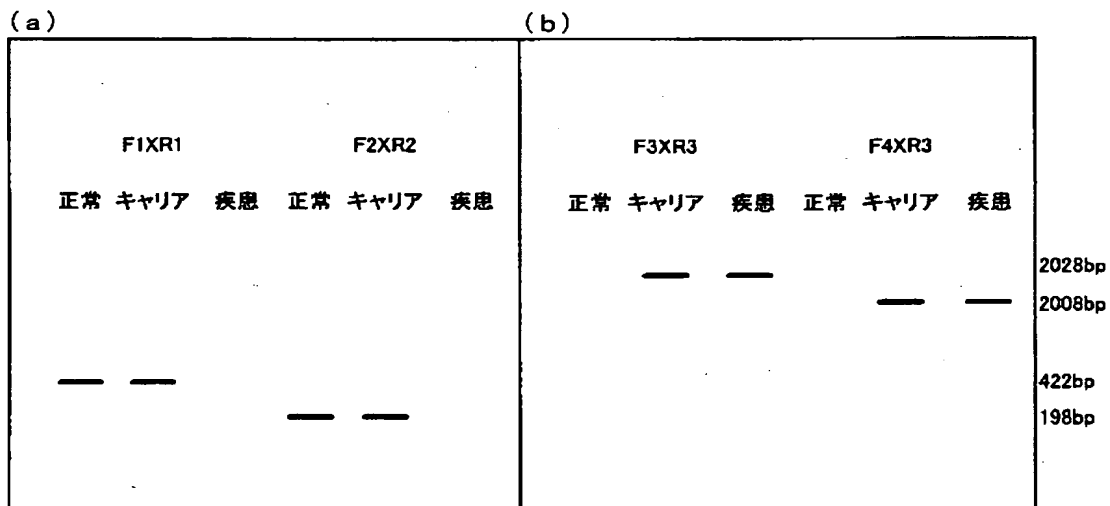
(b) Hsp70 変異型の検出：Hsp70 遺伝子の変異のあるゲノミックDNA を鋳型とすれば、PCR で増幅することを示す電気泳動パターン図である。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ウシHsp70 欠損症の遺伝子診断法を提供すること、具体的には対象遺伝子の周辺の領域を特異的に増幅せしめ、DNA 欠損を検知することにより診断を行う方法及びそのためのキットを提供すること。

【解決手段】 下記の工程を含むウシのHsp70 欠損症の遺伝子診断法であって、変異部位を含む領域がウシHsp70 遺伝子の塩基配列中、配列表の配列番号 1 に示される塩基配列の1997～11030 位を含む領域であることを特徴とするウシのHsp70 欠損症の遺伝子診断法。

(a) ウシの核酸試料を得る工程、

(b) 工程 (a) にて得られた核酸試料を遺伝子増幅反応に付して、ウシのHsp70 遺伝子に存在しうる変異部位を含む領域が増幅された核酸断片を得る工程、

(c) 工程 (b) の核酸断片について変異の存在を調べる工程、

【選択図】 なし

特 2002-327856

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-327856
受付番号	50201704587
書類名	特許願
担当官	塩原 啓三 2404
作成日	平成15年 1月 6日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年11月12日

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [301029403]

1. 変更年月日 2001年 5月 1日

[変更理由] 新規登録

住 所 福島県西白河郡西郷村大字小田倉字小田倉原1番地

氏 名 独立行政法人家畜改良センター



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [595038556]

1. 変更年月日 1995年 2月22日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都文京区湯島三丁目20番9号 綿羊会館  
氏 名 社団法人畜産技術協会